Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
Direktor Professor Dr. F. Eichholtz

STANFORD UNIVERSITY
MAR
8
1938
LIBRARY

Über den Einfluss der biologischen Säuerung auf den Gehalt an Vitamin C

Lane Medical Librar

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der zahnärztlichen Doktorwürde

einer

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität zu Heidelberg

vorgelegt von

Herbert Hanns Becker
Zahnarzt
Ottweiler/Saar

Heidelberg 1936

Druck: Kranz und Heinrichmöller

Aus einer überaus reichhaltigen Literatur der letzten Jahre ergeben sich immer neue Beweise für den Zusammenhang von Zahnkrankheiten mit einem Vitaminmangel in der Nahrung. Die für die physiologische Zahnentwicklung notwendige Vollwertigkeit der Nahrung ist in unseren Breiten umso schwieriger zu erreichen, als monatelang von den Vorräten der Erntezeiten gelebt werden muß, in denen der Vitamingehalt nur unter ganz bestimmten Voraussetzungen erhalten bleibt. Insbesondere sind es die Vitamine C und B_1, die bei den gebräuchlichen Verfahren der Konservierung zum größten Teil oder vollständig zerstört werden. Besonders empfindlich ist von diesen beiden das Vitamin C, das bei vielen Konservierungsverfahren restlos vernichtet wird, während B_1 in gefährlicher Weise nur dann betroffen wird, wenn das Verfahren unter Zusatz von Alkali arbeitet. Die übrigen Vitamine, sofern sie überhaupt in den natürlichen Produkten erhalten waren, werden durch die Konservierungsverfahren wenig betroffen, und ein gefährliches Defizit an anderen Vitaminen ist daher in den Winter- und Frühjahrsmonaten nicht zu befürchten, wenn Nahrungsmittel mit einem genügenden natürlichen Gehalt an solchen Vitaminen zur Verfügung stehen. Die Konservierungsverfahren lassen, so weit sich bis heute übersehen läßt, die Vitamine A, B_2—B_6, D und E anscheinend unberührt.

Vorausgesetzt, daß in den Frühjahrs- und Wintermonaten genügende Mengen von Schutzstoffen, wie Milch, konservierte Gemüse, konserviertes Obst zur Verfügung stehen, wird man daher in unseren Breiten in der Hauptsache mit einem Defizit an Vitamin C zu rechnen haben.

Arbeiten aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg haben es sich zur Aufgabe gemacht, die beim Vorgang der sauren Konservierung von Nahrungsstoffen auftretenden chemischen Veränderungen zu studieren und im Rahmen dieser Arbeit soll nun berichtet werden über den veränderten Gehalt an C-Vitamin unter dem Einfluß der biologischen Konservierung mit Hilfe des Bacterium Azetylcholini (Keil-Weyrauch). Dieses Bacterium ist nicht nur verantwortlich für den regelrechten Ablauf bei der Gärung von Weißkraut zu Sauerkraut, sondern gleichzeitig auch für die Konservierung von sauren Gurken, sauren Bohnen und für die saure Silage der tierischen Futtermittel.

Die bisher bekannten Abbauvorgänge sind die folgenden. Geringe Mengen des in der Pflanze enthaltenen Eiweißes werden bei der sauren Silage in Histamin und Putreszin durch Fäulnisvorgänge, z. B. im Sauerkraut, abgebaut. Sie sind jedoch, ebenso wie das entstehende Azetylcholin, völlig unbedenklich. Der übrige, und zwar der größte Teil des Eiweißes bleibt in unzersetzter Form in den sauer konservierten Nahrungsmitteln erhalten.

Die vergärbaren Kohlehydrate und der Zucker werden teilweise in Milchsäure aufgespalten, zum größten Teil bleiben sie in ihrer ursprünglichen Form erhalten, die Milchsäure ist vollkommen unschädlich und wird im Stoffwechsel verwertet. Der bei der Vergärung der Zucker und Kohlehydrate eintretende Verlust an Nährwert ist gering.

Fette werden bei der sauren Gärung nicht abgebaut, sie bleiben vollkommen unzersetzt erhalten.

Die lebenswichtigen Mineralsalze der Pflanzen bleiben ebenfalls fast völlig erhalten, der Mineralgehalt des Preßsaftes hindert sie, aus den Blättern und Knollen der Pflanzen auszutreten.

So enthält ein biologisch gesäuertes Nahrungsmittel alle zum Leben notwendigen Nährstoffe sowie die nötigen Ergänzungs- und die wichtigen Schutzstoffe, ebenfalls den größten Teil der Mineralien und Geschmacksstoffe.

Wir haben uns nun mit der Veränderung im Gehalt an Vitamin C beschäftigt.

Methode.

Die von uns angewandte Methode zur Bestimmung des Vitamins C beruht auf dem Verfahren von Tillmanns und Hirsch[1]. Nach den Angaben von Martius und Euler[2] modifiziert, wurde durch Zusatz von Trichloressigsäure ein P_h von 2,5—2,7 eingehalten, um eine eventuelle Mittitration von Glutation, Cystin usw. zu verhindern. Die von uns auf Grund dessen angewandte Methode schließt sich der im hiesigen Pharmakologischen Institut üblichen von Herold und von Klotz[3] an.

Benutzt wurde von uns dazu einerseits unvergorener, andererseits der gleiche mit verschiedenen Bakterienstämmen vergorene Gurkensaft. Die beimpften Versuchsröhrchen wurden bei einer Temperatur von 25 Grad aufbewahrt und täglich einige davon bestimmt.

Zur Bestimmung wurde 2,6 - Dichlorphenolindophenol als Indikator benutzt. Diesen stellten wir täglich frisch her derart, daß wir zu 25 cm^3 kochendem Aqua dest. 5mg 2,6 - Dichlorphenolindophenol gaben. Die erhaltene blaue Lösung wurde alsdann abgekühlt und filtriert.

---

[1] Tillmanns und Hirsch, Biochem. Z. 250, S. 312, Jahrg. 1935.

[2] Martius und Euler, Biochem. Z. 271. S. 9, 1934.

[3] Herold und Klotz, Dissertationen im Pharm. Inst. der Univ. Heidelberg.

Trichloressigsäure wurde in 40%iger wässriger Lösung angewandt, die wir uns ebenfalls täglich frisch ansetzten.

Der mit Trichloressigsäure zu gleichen Teilen versetzte zu untersuchende Gurkensaft, es wurden stets 3—5 cm^3 verwandt, je nach Inhalt der Röhrchen, wurde bis zur Entfärbung des Indikators titriert. Die Titration wurde möglichst schnell vorgenommen. Die erhaltenen Werte wurden sodann umgerechnet. Der Inhalt der mit vergorenem Gurkensaft gefüllten Untersuchungsröhrchen wurde stets durch Kieselgur filtriert, um auch die in den Bakterienleibern enthaltene C-Vitaminmenge bestimmen zu können.

Die filtrierten Bakterienleiber wurden verrieben, mit Trichloressigsäure und destill. Wasser zu gleichen Teilen versetzt und filtriert. Danach wurde in der oben beschriebenen Weise titriert und umgerechnet.

Vor dem Beimpfen bestimmten wir aus zwei der Röhrchen den C-Vitamingehalt des unvergorenen Gurkensaftes. Aus den beimpften Röhrchen bestimmten wir den Gurkensaft und die aus ihm filtrierten Bakterien getrennt.

Zur Kritik der Methode sind folgende Tatsachen festzustellen. Es ist nicht mit Sicherheit erwiesen, daß, wie man früher annahm, die unbekannte Substanz, die titriert wird, allein das Vitamin C ist. Von bekannten biochemischen Stoffen gab vielmehr Cystein und Glutathion die gleiche Reaktion, bei dem angewandten P_H allerdings viel schwächer als das Vitamin C. Unzweifelhaft indessen sind noch weitere unbekannte Stoffe in Pflanzensäften vorhanden, die eine positive Tillmannsche Reaktion geben, insbesonders solche Stoffe, bei denen die Umsetzung nicht prompt erfolgt wie beim Vitamin C, sondern erst nach längerem Stehenlassen. Infolgedessen wurde auch der größte Wert darauf gelegt, daß möglichst schnell titriert wurde.

Dienen die Pflanzensäfte als Nährboden für Bakterien, so ist mit weiter stark reduzierenden Stoffen aus den Bakterienleibern zu rechnen. K. Bernhauer, B. Görlich und E. Köcher[4] berichten, daß Raistrick und seine Mitarbeiter die Bildung von Derivaten der γ Methyltetronsäure, sowie der γ Tetronyl-essigsäure als Stoffwechselprodukte des Pen. Charlesii festgestellt hätten. Diese Säuren zeigen Analogien der Struktur mit der Ascorbinsäure. Raistrick und seine Mitarbeiter glauben, daß eventuell eine dieser Säuren für das Reduktionsvermögen in ihren Versuchen verantwortlich gemacht werden könnte.

Indessen ist immer noch das Tillmannsche Reagens diejenige chemische Methode, die am sichersten den Gehalt an Vitamin C erfaßt, wenn man nicht zu den sehr viel schwierigeren Methoden des Tierexperimentes übergehen will. Aus diesem Grunde haben wir die Titrierung mit 2,6-Dichlorphenolindophenol beibehalten, sind uns allerdings bewußt, daß das, was wir messen, möglicherweise zum Teil etwas anderes ist als Vitamin C, obwohl aller Wahrscheinlichkeit nach der größte Teil des titrierten Stoffes unter den Versuchsbedingungen Vitamin C ist.

Die Versuche wurden begonnen, weil uns die praktische Frage vorgelegt wurde, ob in sauer konservierten Gemüsen genügende Mengen von Vitamin C vorhanden sind. Sie wurden aber weiterhin bedeutungsvoll dadurch, daß von anderen pflanzlichen Lebewesen eine Synthese von Vitamin C beschrieben worden ist.

Aus der Literatur über „die Bildung C-Vitamin ähnlicher Substanzen durch Pilze und Bakterien“[5] ist bekannt, daß infolge der Einwirkung von Aspergillus niger auf Rohrzucker-

[4] K. Bernhauer, B. Görlich, E. Köcher Biochem. Z. S. 60, Bd. 286, 1936.

[5] K. Bernhauer, B. Görlich, E. Köcher Biochem. Z. S. 60, Bd. 286, 1936.

lösungen eine Substanz gebildet wurde, durch die 2,6-Dichlorphenolindophenol sowie Jod in saurer Lösung reduziert wurden. Dieses Verhalten ist charakteristisch für die l-Ascorbinsäure sowie andere reduktonartige Stoffe. Daß es sich bei der in den Kulturflüssigkeiten auftretenden reduzierenden Substanz um einen ascorbinsäureähnlichen Körper handelt, schließt man aus folgendem: Nach Dewjatnin und Doroschenka[6] werden durch Fällung mit Bleiacetat in Gegenwart von Calciumcarbonat die meisten reduzierenden Fremdstoffe beseitigt. Das Reduktionsvermögen der untersuchten Kulturlösungen blieb erhalten, trotz Verminderung des Reduktionswertes auf etwa $^3/_4$ bis $^2/_3$ des ursprünglichen.

Auch S. Hermann und N. Fodor[7] berichten, daß bei Einwirkung von „Kombucha", einer Symbiose einiger Essigbakterien und Hefen, auf Glucose und Rohrzucker eine reduzierende Substanz auftrete. Auf Tierversuche gestützt, suchten die Autoren wahrscheinlich zu machen, daß es sich bei dieser reduzierenden Substanz um C-Vitamin handelt.

In den Ausführungen von K. Bernhauer, B. Görlich und E. Köcher[8] über die Art des verwendeten Pilzstammes wird der Vermutung Ausdruck gegeben, daß zur Bildung des reduzierenden Stoffes unter den Pilzen vor allem gute Säurebildner geeignet wären. C-Vitamin findet sich ja auch besonders reichlich in stark sauren Pflanzensäften. Daß jedoch mit der Säurebildung kein direkter Zusammenhang festzustellen ist, zeigten vergleichende Versuche mit verschiedenen Pilzstämmen.

Demnach soll ein sehr schlechter Säurebildner, der früher sehr gut Säure bildete, fast die gleichen Werte ergeben

[6] Dewjatnin und Doroschenka, Biochem. Z. 270, S. 118, 1935.

[7] S. Hermann und N. Fodor, Biochem. Z. 276. S. 323, 1935.

[8] K. Bernhauer, B. Görlich, E. Köcher a. a. O.

haben, wie ein recht guter Säurebildner, andererseits sollen Pilze mit relativ gutem Vermögen zur Bildung des reduzierenden Stoffes auch gute Säurebildner sein.

Schon im Jahre 1923 wurde die Vitamin-B-Bildung durch auf vitamin-B-freien Nährböden gezüchtete Bakterien nachgewiesen. Der Nachweis erfolgt zuerst für den Bac. vulgatus (Scheunert und Schieblich[9]), der der Magendarmflora, besonders der Pflanzenfresser eigen ist. Auch für andere Mikroorganismen wurde der Nachweis der Fähigkeit zur Vitamin-B-Bildung erbracht. So für den Pfeifferchen Bacillus und Bacillus timothy, für Bacterium coli. Auch bei zahlreichen anderen pflanzlichen Mikroorganismen wurden die gleichen synthetischen Fähigkeiten festgestellt.

Über Vitamin-B-Bildung durch Aspergillus oryzae berichten Scheunert und Schieblich.[10] Sie verwendeten zur Zucht Nährböden, die in ihrer Zusammensetzung der vitamin-B-freien Nahrung entsprechen, die zu Vitaminversuchen an Ratten gebräuchlich ist. Bereits im Jahre 1929 war gezeigt worden, daß dieser Pilz Vitamin B enthält. Die Versuche von Scheunert und Schieblich zeigten, daß Aspergillus oryzae imstande ist, bei Züchtung auf vitamin-B-freien Nährböden, Vitamin B_1 und den Vitamin - B_2 - (G) Komplex zu synthetisieren, während der Pilz nicht vermag, Vitamin A oder seine Vorstufe Carotin zu bilden. J. T. Skinner, W. H. Petersen und H. Steenbock[11] erklären in ihrer Arbeit über „Nährwert von Schimmelpilzmycel", daß getrocknetes Schimmelpilzmycel eine genügende Menge B-Vitamin enthielt, um Polyneuritis zu verhindern

---

[9] Scheunert und Schieblich, Biochem. Z. 286, S. 66, 1936. Schieblich, Biochem. Z. 139, S. 57, 1923.

[10] Scheunert und Schieblich, Biochem. Z. 286, S. 66, 1936.

[11] J. T. Skinner, W. H. Petersen, H. Steenbock, Biochem. Z. S. 169, Bd. 267, 1933.

und das Wachstum zu unterstützen, wenn der Gehalt daran 20% war. Ein Gehalt von 5% soll jedoch unwirksam gewesen sein.

Über den Einfluß der Zusammensetzung des Nährbodens auf die Vitamin-B-Bildung durch Bakterien und die Synthese dieses Vitamins durch Bact. lactis aerogenes Escherisch und Vibrio alcaligenes berichtet M. Schieblich.[12] Dazu wurde der früher benutzte vitamin-B-freie Nährboden verbessert, da auf ihm oben genannte Mikroorganismen nicht gediehen. Ergänzt wurde der Nährboden mit Pepton, Traubenzucker und durch Zusatz von Zitronensäure und Natriumammoniumphosphat. Schieblich sagt, daß durch eine Verbesserung des vitamin-B-freien Nährbodens eine erhebliche Steigerung des Vitamin-B-Bildungsvermögens erreicht worden sei. Die auf dem einfachen Nährboden bestehenden Unterschiede in der Fähigkeit der Vitamin-B-Synthese seien jedoch erhalten geblieben. Diese Versuche wurden mit Bacillus mycoides und Bacterium prodigiosum vorgenommen. Bacterium lactis aerogenes Escherich und Vibrio alcali-genes L. et N. zeigten beide auf verbessertem Nährboden ähnliches Vitamin-B-Bildungsvermögen wie Bacterium prodigiosum.

Ergebnisse der Versuche.

Zu unseren Untersuchungen wurden mehrere Stämme des Bacterium Acetylcholini benutzt, die wir von den im Eisschrank aufgehobenen Hauptstämmen auf die einzelnen mit Gurkensaft versehenen Untersuchungsröhrchen überimpften.

So überimpften wir am 17. Oktober den Stamm 10 S. Der am gleichen Tage zu dieser Versuchsreihe gehörende untersuchte unvergorene Gurkensaft ergab einen Vitamin C-Gehalt von 0,0188 mg pro cm^3. Die erste Untersuchung von mit Stamm 10 S ver-

[12] M. Schieblich, Biochem. Z. S. 19, Bd. 259, 1933.

gorenem Gurkensaft, die zwei Tage später am 19. Oktober stattfand, zeigte im Gurkensaft einen C-Vitamingehalt von 0,0212 mg pro cm^3, während die Bakterien selbst 0,0143 mg pro cm^3 ergaben. Die Untersuchungen der folgenden Tage ergaben ein Ansteigen des Vitamin-C-Gehaltes sowohl im Gurkensaft wie auch in den Bakterien selbst.

Bei einer weiteren Serie von Stämmen, die ebenfalls am 17. Oktober angesetzt waren, jedoch erst am 23. Oktober und 24. Oktober untersucht wurden, war das Ergebnis bei den am ersten Tage untersuchten drei Stämmen noch auffallender. Bei diesen drei Stämmen war der Gehalt an Vitamin - C - für den Gurkensaft 0,0626 mg, 0,0518 mg und 0,0427 mg pro cm^3, bei den Bakterien entsprechend kleiner. Für die übrigen zehn Stämme blieben die Ergebnisse zwischen 0,0190 und 0,0295 mg/cm^3 für den Gurkensaft, für die Bakterien zwischen 0;0128 und 0,0208 mg/cm^3. Für diese Serie ist der gleiche Gurkensaft wie für Stamm 10 S benutzt worden. Demnach dürfte von den oben genannten 10 Stämmen der Stamm 2 ein besonders guter Vitamin-C-Bildner sein.

Eine dritte Serie von Versuchsröhrchen, die mit Stamm P 66 a vergoren waren, ergab für den Gurkensaft durchweg einen höheren C-Vitamingehalt als für die Bakterien, und zwar für den Gurkensaft zwischen 0,0148 als niedrigstes und 0,0287 mg/cm^3 als höchstes Ergebnis nach sechs Tagen. (Mittelwerte von je zwei Untersuchungen.)

Das Ergebnis unserer Untersuchungen zeigte, daß durch die Einwirkung der Bakterien der C-Vitamingehalt des Gurkensaftes gestiegen ist. Der C-Vitamingehalt der Bakterien selbst ist dabei geringer als der des untersuchten Gurkensaftes aus dem sie abfiltriert waren. Die zuletzt untersuchten Röhrchen weisen einen etwas höheren Gehalt an C-Vitamin auf als die zuerst untersuchten.

Die Untersuchungen ergaben also einen besonders hohen Vitamin-C-Gehalt von biologisch gesäuertem Gemüse, unter der wahrscheinlich zutreffenden Voraussetzung, daß die titrierte Substanz in der Tat Vitamin-C ist.

Zeit	Unverg. Gurkensaft
17. X.	0,0188
17. X.	0,0188

Stamm 10 S: angesetzt am 17. X., erste Bestimmung 19. X.

Zeit	Gurkensaft	Mittelwerte	Bakterien
19. X.	0,0237	0,0212	0,0158
19. X.	0,0188		0,0129
20. X.	0,0476	0,0455	0,0311
20. X.	0,0435		0,0320
21. X.	0,0435	0,0314	0,0411
21. X.	0,0257		0,0308
22. X.	0,0526	0,0526	0,0300

Mittelwerte: Bakt. + Flüssigk.
0,0356
0,0771
0,0705

Zeit	Unverg. Gurkensaft
17. X.	0,0188
17. X.	0,0188

Stamm	Zeit	Flüssigkeit	Bakterien	Summe
2	23. X.	0,0626	0,0471	0,1097
3	23. X.	0,0518	0,0257	0,0775
4	23. X.	0,0427	0,0336	0,0763
5	24. X.	0,0202	0,0142	0,0344
6	24. X.	0,0190	0,0135	0,0325
7	24. X.	0,0200	0,0145	0,0345
9	24. X.	0,0150	0,0128	0,0278

Stamm	Zeit	Flüssigkeit	Bakterien	Summe
10	24. X.	0,0205	0,0142	0,0347
11	24. X.	0,0295	0,0198	0,0493
IX	24. X.	0,0268	0,0208	0,0476
12	24. X.	0,0295	0,0188	0,0483
14	24. X.	0,0275	0,0185	0,0460
16	24. X.	0,0264	0,0182	0,0446

Zeit	Unverg. Gurkensaft
23. X.	0,0302
23. X.	0,0302

Stamm P66a, angesetzt am 23. X.

Zeit	Flüssigkeit	Bakterien	Summe
24. X.	0,0298	0,0208	0,0506
24. X.	0,0276	0,0202	0,0478
25. X.	0,0178	0,0152	0,0330
26. X.	0,0147	0,0147	0,0294
26. X.	0,0150	0,0147	0,0297
27. X.	0,0200	0,0200	0,0400
27. X.	0,0200	0,0200	0,0400
28. X.	0,0213	0,0203	0,0416
28. X.	0,0204	0,0200	0,0404

Zusammenfassung.

1. Der Gehalt von biologisch gesäuertem Gemüse an Vitamin-C entspricht dem natürlichen Gehalt. Eine Zerstörung von Vitamin-C findet daher voraussichtlich nicht statt.

2. Bei verschiedenen Stämmen von Bacterium Acetylcholini fanden sich bei Vergärung des gleichen Gurkensaftes Unterschiede, die möglicherweise auf eine Synthese des Vitamins C durch die Bakterien hindeutet. Diese Frage bedarf der weiteren Bearbeitung.

Am Schlusse dieser Arbeit möchte ich nicht versäumen, meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. F. Eichholtz, für die freundliche Überlassung des Themas meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Auch Herrn Dr. Möller, der mich, stets hilfsbereit, mit Rat und Tat unterstützte, danke ich herzlichst.

Lebenslauf.

Am 31. März 1912 bin ich in Ottweiler-Saar geboren. Von Ostern 1922 ab besuchte ich das Gymnasium St.Wendel-Saar und legte am 16. März 1933 in Bensheim a. d. B. die Reifeprüfung ab. Seit dem Sommersemester 1933 widmete ich mich an der Universität Heidelberg dem Studium der Zahnheilkunde und bestand dort am Ende des Sommersemesters 1936, nach sieben Semestern Studium, das Staatsexamen.